

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/39984 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **A61K 9/50**

(74) Mandataire : **CABINET PLASSERAUD**; 84 rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/03625

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :

19 novembre 2001 (19.11.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/14876 17 novembre 2000 (17.11.2000) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; Parc du Moulin à Vent, 33 Avenue du Docteur Georges Lévy, F-69693 VENISSIEUX CEDEX (FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MEDICINE BASED ON ANTI-HYPERGLYCAEMIC MICROCAPSULES WITH PROLONGED RELEASE AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : MÉDICAMENT À BASE DE MICROCAPSULES D'ANTI-HYPERGLYCEMIANT À LIBÉRATION PROLONGÉE ET SON PROCÉDE DE PRÉPARATION

(57) Abstract: The invention concerns an oral galenic form for prolonged release of anti-hyperglycaemic (metformin) active principles. Said medicine enables to obtain an efficient therapeutic protection over 24 hours by overcoming the problems of bypass of the absorption window and the massive localised release of active principles. Therefor, said medicine comprises several thousand anti-hyperglycaemic (metformin) microcapsules each consisting of a core comprising at least an anti-hyperglycaemic agent and of a coating film applied on the core and enabling the prolonged release in vivo of the anti-hyperglycaemic agent. Said microcapsules have a grain size distribution ranging between 50 and 100 microns. The reproducibility of the transit kinetics and hence of bioavailability are very high. There results for the patient a lesser risk of hyperglycaemic or hypoglycaemic. The invention also concerns the preparation of said medicine and the use of a plurality of said microcapsules for making an anti-hyperglycaemic medicine. The invention is applicable to the treatment of type II diabetes.

(57) Abrégé : L'invention concerne une forme galénique orale pour la libération prolongée de principes actifs anti-hyperglycémiques (metformine). Ce médicament permet d'obtenir une couverture thérapeutique performante sur 24 heures en surmontant les problèmes de bippasse de la fenêtre d'absorption et de libération massive localisée de principes actifs. A cette fin, ce médicament comprend plusieurs milliers de microcapsules d'anti-hyperglycémiques (metformine) constituées chacune par un coeur comportant au moins un anti-hyperglycémique et par une pellicule d'enrobage appliquée sur le coeur et permettant la libération prolongée in vivo de l'anti-hyperglycémique. Ces microcapsules ont une granulométrie comprise entre 50 et 1000 microns. La reproductibilité de la cinétique de transit et donc la biodisponibilité sont très bonnes. Il en résulte pour le patient un risque moindre d'hyper ou d'hypoglycémie. L'invention concerne également la préparation de ce médicament et l'utilisation d'une pluralité de microcapsules telles que définies ci-dessus pour la fabrication d'un médicament anti-hyperglycémique. Application: traitement des diabètes de type II.



WO 02/39984 A2

MÉDICAMENT À BASE DE MICROCAPSULES D'ANTI-HYPERGLYCÉMIANT À
LIBÉRATION PROLONGÉE ET SON PROCÉDÉ DE PRÉPARATION

Le domaine de la présente invention est celui des formes
5 galéniques orales permettant la libération prolongée de
principes actifs anti-hyperglycémiques. Plus spécifiquement, la
présente invention concerne un nouveau médicament administrable
par voie orale et permettant la libération prolongée in vivo
d'un biguanide tel que la metformine ou la buformine ou tout
10 sel pharmaceutiquement acceptable de ces composés, comme, par
exemple, l'hydrochlorure de metformine.

Par formes galéniques orales à libération prolongée, on
entend les formes galéniques orales permettant une libération
ralentie des principes actifs, par rapport aux formes
15 galéniques conventionnelles administrées selon la même voie.
Cette définition est celle donnée par l'Agence Européenne pour
l'Evaluation des Produits Médicaux, dans sa Note sur la Qualité
des Produits à Libération Modifiée du 29 juillet 1999.

Cette définition exclut les formes galéniques orales à
20 libération retardée, qui consistent en des formes galéniques
permettant de retarder la libération des principes actifs,
pendant une durée prédéfinie après administration, cette
libération, équivalente à celle des formes galéniques
conventionnelles, résultant alors d'un décalage de temps sans
25 modification des autres paramètres pharmacocinétiques (Note sur
la Qualité des Produits à Libération Modifiée du 29 juillet
1999, Agence Européenne pour l'Evaluation des Produits
Médicaux).

L'art antérieur comprend de nombreuses propositions
30 techniques pour obtenir des formes à libération prolongée de
produits pharmaceutiques dans le but d'étendre la durée de la
couverture thérapeutique et d'améliorer le confort des patients
et le respect par ces derniers de la posologie. Mais très peu
de travaux ont été consacrés à la mise au point de formes à
35 libération contrôlée d'anti-hyperglycémiques.

Ces anti-hyperglycémiques, et en particulier l'hydro-
chlorure de metformine présente une perméabilité intrinsèque

faible dans les parties distales du tractus gastro-intestinal. Son absorption se fait donc essentiellement dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal. Sa biodisponibilité orale est de l'ordre de 40 à 60%. Elle diminue lorsque la dose
5 augmente, ce qui suggère une absorption saturable ou limitée par la perméabilité et le temps de transit. Les produits présentant une absorption limitée à la partie supérieure du tractus gastro-intestinal, dits "à fenêtre d'absorption", sont considérés comme de mauvais candidats pour les formes orales à
10 libération prolongée. L'administration de ces produits par un système conventionnel à libération prolongée peut effectivement se traduire par des concentrations plasmatiques inférieures au seuil thérapeutique et donc à un traitement inefficace.

Une autre caractéristique de ces anti-hyperglycémiques
15 tels que l'hydrochlorure de metformine est leur très grande solubilité dans l'eau : plus de 300 g/l à 25°C. Cela pose des problèmes lorsqu'il s'agit d'obtenir une formulation présentant une vitesse de libération faible et parfaitement contrôlée, sans décharge brutale "burst effect". Pour pallier cela, il
20 est généralement nécessaire d'utiliser de grandes quantités de polymères pour former une matrice ou une barrière capable de ralentir suffisamment la libération de la metformine pour obtenir le profil de concentration plasmatique souhaité et, dans ce cas, le formulateur a tout intérêt à privilégier les
25 formes monolithiques qui offrent moins de surface à la diffusion du principe actif.

De plus, la dose de principe actif quotidienne peut être de l'ordre du gramme. C'est le cas notamment pour la metformine. Il en résulte que les formes à libération prolongée
30 de metformine entre autres, peuvent présenter une grande taille. Une telle forme monolithique unitaire de grande taille peut subir une vidange gastrique aléatoire et donc rester durant un temps mal contrôlé en amont de sa fenêtre d'absorption. Il en résulte une absorption du principe actif
35 aléatoire et mal contrôlée, en quantité et en durée. Ce genre de déconvenues ("bipasse") fréquentes a pour conséquence dans le cas des anti-hyperglycémiques, que la glycémie ne peut être

correctement contrôlée, ce qui peut avoir des conséquences extrêmement préjudiciables pour le patient diabétique.

La forme galénique monolithique de grande taille peut également se trouver bloquée dans les méandres du tractus gastro-intestinal. Il se produit alors une libération massive et très localisée du principe actif ("dose dumping") qui, non seulement ne sera pas absorbé selon le profil recherché, mais qui de surcroît est susceptible de provoquer des lésions locales des tissus à l'endroit de la libération massive.

10 Ainsi, l'art antérieur ne décrit que des formes monolithiques capables de demeurer un certain temps dans l'estomac (gastrorétention), de façon à libérer la metformine en amont de sa fenêtre d'absorption.

La demande de brevet WO 98/55107 décrit des comprimés 15 comportant une matrice de polymère hydrophile de haut poids moléculaire (polyoxyéthylène) contenant la metformine. Une fois ingérée, cette matrice gonfle jusqu'à atteindre des grandes dimensions (e.g. 7,2 mm diamètre x 8,8 mm longueur) favorisant sa rétention par l'estomac, tout en limitant la vitesse de 20 dissolution de la metformine.

Le brevet WO 99/47125 décrit un comprimé monolithique à libération contrôlée formé :

- d'un cœur contenant :

- l'actif anti-hyperglycémique (metformine),
- 25 ▪ un agent liant hydrosoluble (polyvinylpyrrolidone),
- un promoteur d'absorption (sel biliaire),

- et d'une membrane semi-perméable (dérivé insoluble de cellulose) enrobant le cœur et percée d'au moins un trou.

De manière traditionnelle dans les techniques de fabrication de comprimés, les comprimés selon le WO 99/47125 sont obtenus à 30 partir de granulés non enrobés, préparés par granulation humide, c'est à dire agglomération de particules de metformine à l'aide de l'agent liant susmentionné. Les granulés ont une taille significativement supérieure à celle des particules de 35 metformine de départ.

Cette forme galénique est censée avoir une couverture thérapeutique sur 24 heures après administration orale à l'état nourri.

5 L'un des inconvénients de cette forme galénique réside dans la présence de ce promoteur d'absorption qui peut fragiliser la paroi intestinale et peut, en administration prolongée, avoir des effets secondaires indésirables.

10 Un autre inconvénient est que cette forme "comprimé" présente un temps de résidence gastrique variable, à la différence d'une forme galénique microparticulaire, dont le temps de résidence est pondéré par le grand nombre de particules.

Le brevet WO 99/47128 décrit un système galénique oral à libération prolongée, qui permet une résidence prolongée dans l'estomac.

15 Il s'agit d'une forme adaptée à des principes actifs dotés d'une forte solubilité dans l'eau et présentant une fenêtre d'absorption limitée à la partie haute du tractus gastro-intestinal (Metformine). Ce système est biphasique et comprend:

20 ➤ une phase interne particulaire formée de granules individualisés chargés en PA. La particularité de ces granules est d'être non enrobés et de comporter un ou plusieurs excipients qui peuvent être :

o un polymère hydrophobe : copolymère de l'acide (méth)acrylique (EUDRAGIT®), éthylcellulose,

25 o et/ou un polymère hydrophile : carboxyméthylcellulose de sodium ou alginate de sodium,

o et/ou d'autres composés hydrophobes : cires, alcools gras, esters d'acide gras,

30 ➤ et une phase continue solide externe dans laquelle sont noyées les particules de la phase interne, cette phase solide externe continue comportant :

o un ou plusieurs polymères hydrophiles : [hydroxypropylméthyl-cellulose -HPMC- (de viscosité 5 cps et 1.10^5 cps), cellulose microcristalline],

35 o et/ou un ou plusieurs polymères hydrophobes,

o et/ou un ou plusieurs autres composés hydrophobes (cires, alcools gras, esters d'acide gras).

Ce système galénique est, de préférence, sous forme de comprimés oblongs. Il est présenté comme ayant un temps de résidence accru dans la partie haute du tractus gastro-intestinal (estomac/intestin grêle) par effet d'augmentation de
5 taille, sans toutefois atteindre une limite supérieure conduisant à l'occlusion.

Un inconvénient de cette forme galénique est qu'elle présente un temps de résidence gastrique variable, à la différence d'une forme galénique microparticulaire, dont le temps de résidence
10 est pondéré par le grand nombre de particules.

Par ailleurs, il est vraisemblable que ce système galénique selon le WO 99/47128 (de préférence un comprimé) ait une faible tenue mécanique en milieu gastrique. Dans une telle hypothèse la libération du PA ne serait plus contrôlée.

15 Ces trois inventions réfèrent à des formes monolithiques de dimensions importantes, devant être ingérées comme telles. Ainsi :

- o pour une dose de 1 g de metformine: le brevet WO 98/55107 propose 8 comprimés de 10,4 x 6,6 mm contenus dans 4
20 gélules ;
- o pour une dose de 1 g de metformine: le brevet WO 99/47128 propose 2 comprimés oblongs de grandes dimensions ;
- o pour une dose de 850 mg de metformine: le brevet WO-99/47125 propose un comprimé de diamètre 12 mm.

25 Ces formes peuvent poser des problèmes d'observance pour les patients ayant des difficultés à avaler.

De plus, le profil de concentration plasmatique obtenu à partir de ces systèmes est fortement conditionné par le temps de résidence dans l'estomac, lequel peut faire l'objet de grandes
30 variations interindividuelles. Les systèmes monolithiques subissent et quelquefois amplifient l'effet de ces variations interindividuelles, ce qui peut conduire à l'inefficacité du traitement chez une portion non négligeable de la population traitée.

35 Enfin, ces systèmes galéniques sont susceptibles d'entraîner soit des problèmes de bipasse de la fenêtre d'absorption, soit

des problèmes d'accumulation localisée du principe actif, et de lésions subséquentes.

La demande PCT WO-96/11675 décrit des microcapsules médicamenteuses et/ou nutritionnelles pour l'administration per os de principe actif, à l'exclusion de l'aspirine et sans précision d'une classe particulière de principes actifs, à savoir les anti-hyperglycémiques et en particulier la metformine. Ces micro-capsules médicamenteuses sont constituées par des particules de principe actif (sans que les anti-hyperglycémiques soient spécifiés), recouvertes chacune d'une pellicule d'enrobage comprenant au moins un polymère filmogène P1, au moins un polymère azoté P2, au moins un plastifiant et au moins un tensioactif et/ou lubrifiant. Les micro-capsules médicamenteuses selon le WO-96/11675 n'apportent pas de solution au problème particulier de la couverture thérapeutique sur 24 heures d'anti-hyperglycémiques et à une fenêtre d'absorption dans les parties hautes du tractus gastro-intestinal, très solubles dans l'eau et devant être ingérées à hautes doses pour chaque prise (1 g par jour).

Le document WO-00/28989 décrit des compositions à libération retard se présentant sous la forme de gélules contenant de multiples cœurs de granulés comprenant un agent de sensibilisation à l'insuline et un autre agent antidiabétique, qui peut être un biguanide tel que la metformine. Les cœurs de granulés peuvent être enrobés d'une composition entérique et notamment constituée par un polymère filmogène tel que l'Eudragit L100-55. Toutefois, ce document ne décrit pas un médicament anti-hyperglycémique administrable per os, se présentant sous la forme de microparticules permettant la libération prolongée du ou des principes actifs anti-hyperglycémiques.

Dans un tel état de la technique, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de fournir un nouveau système galénique, pour l'administration orale de principes actifs anti-hyperglycémiques, ce système devant permettre

d'obtenir une couverture thérapeutique performante sur 24 heures en surmontant les problèmes de bipasse de la fenêtre d'absorption et de libération massive localisée de principe actif.

5 Un objectif de la présente invention est de proposer une forme pharmaceutique constituée d'un grand nombre, de l'ordre de plusieurs milliers, de microcapsules d'anti-hyperglycémique, et particulièrement de metformine, cette multiplicité de microcapsules assurant statistiquement une bonne
10 reproductibilité de la cinétique de transit de l'anti-hyperglycémique (metformine), dans tout le tractus gastro-intestinal. Il en résulte un meilleur contrôle de la biodisponibilité, et donc pour le patient un risque moindre d'hyperglycémie ou d'hypoglycémie.

15 Un objectif de la présente invention est de proposer une forme galénique multi-microcapsulaire à libération prolongée d'anti-hyperglycémiques, et particulièrement de metformine, cette forme galénique étant constituée par un comprimé dispersible dans un liquide ou dans la bouche, par un comprimé effervescent, ou par de la poudre en sachets.
20

Un autre objectif de la présente invention est de proposer une forme multi-microcapsulaire à libération prolongée d'anti-hyperglycémiques, et particulièrement de metformine, qui conduise, après administration orale, à un pic plasmatique
25 après plus de 6 heures approximativement.

Un autre objectif de la présente invention est de proposer une forme multi-microcapsulaire à libération prolongée d'anti-hyperglycémiques, et particulièrement de metformine, dont la biodisponibilité n'est pas réduite par une administration à
30 l'état nourri.

Un autre objectif de la présente invention est de proposer une forme multi-microcapsulaire à libération prolongée d'anti-hyperglycémiques, et particulièrement de metformine, assurant une couverture thérapeutique suffisante pour une administration
35 une ou deux fois par jour du principe actif.

Un autre objet de la présente invention est d'obtenir un système multi-microcapsulaire assurant la libération in vitro

des produits anti-hyperglycémiques sur plus de 8 heures tout en évitant l'emploi de fortes quantités de polymères, le titre en principe actif demeurant comparable voire supérieur à celui de formes monolithiques.

5 Un autre objet de la présente invention est de fournir un procédé simple et économique de préparation de la forme galénique multi-microcapsulaire sus-évoquée.

Les objectifs exposés ci-dessus, parmi d'autres, sont obtenus par l'invention qui propose en premier lieu un
10 médicament à base d'au moins un anti-hyperglycémique administrable par voie orale caractérisé:

▪ en ce qu'il comprend une pluralité de microcapsules constituées chacune par un cœur comportant au moins un anti-hyperglycémique et par une pellicule d'enrobage appliquée sur
15 le cœur et permettant la libération prolongée in vivo de (des) l'anti-hyperglycémique(s),

à l'exclusion des pellicules d'enrobage constituées par des compositions entériques et des pellicules d'enrobage de composition ci-après:

- 20 1 - au moins un polymère filmogène (P1) insoluble dans les liquides du tractus, présent à raison de 50 à 90, de préférence 50 à 80 % en poids sur sec par rapport à la masse totale de la composition d'enrobage et constitué par au moins un dérivé non hydrosoluble de la cellulose, à
25 savoir l'éthylcellulose et/ou l'acétate de cellulose ;
- 2 - au moins un polymère azoté (P2) présent à raison de 2 à 25, de préférence 5 à 15 % en poids sur sec par rapport à la masse totale de la composition d'enrobage et constitué par
30 au moins un polyacrylamide et/ou un poly-N-vinylamide et/ou un poly-N-vinyl-lactame, à savoir le polyacrylamide et/ou la polyvinylpyrrolidone ;
- 3 - au moins un plastifiant présent à raison de 2 à 20, de préférence de 4 à 15 % en poids sur sec par rapport à la
35 masse totale de la composition d'enrobage et constitué par au moins l'un des composés suivants : les esters du glycérol, les phtalates, les citrates, les sébaçates, les

esters de l'alcool cétylique, l'huile de ricin, l'acide salicylique et la cutine ;

- 4 - et éventuellement au moins un agent tensioactif et/ou lubrifiant, présent à raison de 2 à 20, de préférence de 4
5 à 15 % en poids sur sec par rapport à la masse totale de la composition d'enrobage et choisi parmi les tensioactifs anioniques, à savoir les sels alcalins ou alcalinoterreux des acides gras, l'acide stéarique et/ou oléique étant préférés, et/ou parmi les tensioactifs non ioniques, à
10 savoir les esters de sorbitan polyoxyéthylénés et/ou les dérivés de l'huile de ricin polyoxyéthylénés, et/ou parmi les agents lubrifiants comme les stéarates de calcium, de magnésium, d'aluminium ou de zinc, ou comme le stéarylfumarate de sodium et/ou le béhénate de glycérol;
15 ledit agent pouvant comprendre un seul ou un mélange des susdits produits ;
- en ce que ces micro-capsules possèdent une granulométrie comprise entre 50 et 1 000 microns, de préférence entre 100 et 750 microns, et, plus préférentiellement encore, entre 200
20 et 500 microns.

Par compositions entériques, on entend les compositions qui confèrent à l'enrobage une résistance à pH acide (pH gastrique) et qui permettent une libération du ou des principes actifs lors d'une remontée de pH.

- 25 Ainsi, le médicament selon l'invention est particulièrement adapté aux principes actifs anti-hyperglycémiques qui ont pour caractéristique d'avoir une fenêtre d'absorption située dans les parties hautes du tractus gastro-intestinal (estomac et début intestin grêle), qui sont
30 très solubles dans l'eau et dont la posologie est de l'ordre de 1g par jour, ce qui impose l'ingestion de grande masse de produit par prise.

- Ce médicament sous une forme galénique "multimicrocapsulaire" composée d'une pluralité de
35 microcapsules, limite nécessairement pour des raisons statistiques le risque de bipasse de la fenêtre d'absorption, et supprime le risque d'accumulation localisée de principe

actif. Il en résulte une absorption optimale d'anti-hyperglycémiques dans la fenêtre d'absorption, en quantité et sur une durée telles que la couverture thérapeutique peut être garantie sur au moins 12h avec toute la sécurité thérapeutique souhaitable (contrôle de la glycémie). En effet, le grand nombre
5 de particules (e.g. de l'ordre de 10 000) permet une distribution reproductible, diminuant ainsi les risques d'hyper et d'hypoglycémie.

Les anti-hyperglycémiques plus particulièrement concernés
10 par l'invention sont ceux choisis dans le groupe comprenant la metformine et ses sels, tels que l'hydrochlorure de metformine.

Les figures 1 et 2 annexées sont des photographies (respectivement avant et après un test de dissolution cf exemples infra) de plusieurs microcapsules constitutives du
15 médicament selon l'invention. Ces photos montrent bien que chaque microcapsule individualisée comprend un coeur enveloppé dans une pellicule d'enrobage gouvernant la libération prolongée du ou des principes actifs anti-hyperglycémiques.

La taille de chaque micro-capsule est inférieure à 1 mm et
20 en pratique comprise entre 200 et 500 μm , comme cela apparaît sur la photo de la figure 1. Il doit être souligné qu'il ne s'agit pas d'un agglomérat de particules d'anti-hyperglycémiques en granules de taille supérieure à 1 mm et dont la matrice est formée par un liant polymère.

25 Le médicament selon l'invention concerne des formes pulvérulentes sèches ou en suspension dans un liquide ou bien encore des formes délitées dans la bouche ou dans un liquide.

En fait, le médicament selon l'invention peut être assimilé à un système galénique original "multi-
30 microcapsulaire" destiné à être facilement administrable *per os* et permettant une libération prolongée *in vivo*, garantissant une couverture thérapeutique sur au moins 12 heures et, de préférence, sur au moins 24 heures.

De préférence, la taille et l'enrobage des microcapsules
35 sont choisis de telle sorte que, toutes choses égales par ailleurs, sa biodisponibilité lors d'une administration orale à

l'état nourri est au moins égale à sa biodisponibilité lors d'une administration orale à jeun.

Suivant une caractéristique préférée de l'invention, la pellicule d'enrobage des microcapsules est conçue de telle sorte qu'après ingestion d'une dose donnée d'anti-hyperglycémique, le temps (Tmax) correspondant à la concentration plasmatique maximale dans la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps, soit supérieur ou égal à 6 heures et la biodisponibilité donnée par l'aire sous la courbe (AUC) est supérieure ou égale à 60 %, de préférence à 80 % par rapport à celle obtenue avec la même dose d'anti-hyperglycémique à libération immédiate.

Ce type de courbes donnant la concentration plasmatique en fonction du temps écoulé après l'ingestion, rend compte de la couverture et de l'efficacité thérapeutique du médicament. Il y a lieu de constater qu'elles sont tout à fait satisfaisantes pour le médicament multi-microcapsulaire et anti-hyperglycémique selon l'invention.

Ainsi, le médicament selon l'invention ouvre des perspectives tout à fait intéressantes pour le traitement des diabètes de type II, seul ou en combinaison avec d'autres médicaments anti-diabétiques tels que l'insuline.

De manière tout à fait surprenante et inattendue, le système galénique oral multi-microcapsulaire selon l'invention ne requiert pas la mise en oeuvre d'importantes quantités de polymères excipients relativement à la masse d'anti-hyperglycémiques. Contrairement à ce qui existe pour les systèmes galéniques connus de type monolithique de grandes dimensions.

Ainsi, suivant une disposition avantageuse de l'invention, la fraction massique moyenne en anti-hyperglycémique des microcapsules est supérieure à 50%, de préférence supérieur ou égal à 60%.

Les problèmes techniques auxquels l'invention apporte remède, sont plus spécifiquement ceux rencontrés pour les anti-hyperglycémiques et en particulier ceux choisis parmi les biguanides de préférence dans le groupe de biguanides

comprenant la metformine et la buformine et leurs sels, la metformine et ses sels étant particulièrement préférés.

Le médicament selon l'invention peut également être défini par des caractéristiques de libération in vitro du ou des anti-hyperglycémique(s), par dissolution en milieu aqueux de la pellicule d'enrobage. D'où il s'ensuit que dans un test de dissolution in vitro dénommé dissolutest de type II conformément à la pharmacopée, la dissolution de l'anti-hyperglycémique s'étend sur au moins 8 heures, de préférence au moins 20 heures.

Le médicament multi-microcapsulaire selon l'invention peut se présenter sous diverses formes galéniques, dont notamment :

- comprimés délitables dans la bouche,
- comprimés délitables par effervescence dans un liquide (eau),
- 15 - comprimés délitables dans un liquide (eau),
- poudres conditionnées en sachet de doses données,
- suspensions de microcapsules dans un liquide (eau),
- gélules contenant une poudre de microcapsules.

20 Suivant un mode de réalisation particulier mais non limitatif de l'invention, le médicament multi-microcapsulaire est constitué par une forme galénique dont la dose d'anti-hyperglycémique est comprise entre 800 et 1200 mg, de préférence entre 900 et 1100 mg, et plus préférentiellement encore de l'ordre de 1000 mg.

Une telle dose convient particulièrement pour le traitement des diabètes de type II, selon une posologie performante permettant de contribuer à maintenir la glycémie à des taux acceptables 24 heures après la prise.

30 Avantageusement, ce médicament multi-microcapsulaire, dont la dose d'anti-hyperglycémique est comprise entre 800 et 1200 mg, de préférence entre 900 et 1100 mg, et plus préférentiellement encore de l'ordre de 1000 mg, se compose de plusieurs milliers de microcapsules telles que définies ci-dessus, cette multiplicité assurant une bonne reproductibilité du transit gastro-intestinal de l'anti-hyperglycémique,

réduisant ainsi le risque d'hypo ou d'hyperglycémie pour le patient.

Pour détailler quelque peu la structure des microcapsules, 5 on précise que le coeur desdites microcapsules peut être par exemple un granulé comportant de l'anti-hyperglycémique et des excipients de granulation et/ou une particule d'anti-hyperglycémiant, de préférence un monocristal.

Dans le coeur des microcapsules, l'anti-hyperglycémique 10 peut être associé à un ou plusieurs excipients. C'est notamment le cas lorsque le coeur est constitué par un granulé. Les excipients alors mis en oeuvre sont ceux qui sont traditionnels dans la granulation.

En pratique, le pelliculage déposé sur chaque granulé peut être 15 constitué par une ou plusieurs macromolécules filmogènes bien connues de l'homme de l'art pour réaliser les formes à libération prolongée. Par exemple, et sans que la liste soit exhaustive, il peut être choisi parmi les familles suivantes : éthers de cellulose, éthers / esters de cellulose, esters de 20 cellulose, diesters de cellulose, triesters de cellulose, acylate de cellulose, diacylate de cellulose, triacylate de cellulose, diacétate et triacétate de cellulose, acétate propionate de cellulose, acétate butyrate de cellulose, polyméthacrylates, cires, copolymères d'acétate de vinyle. 25 De préférence, la macromolécule filmogène est l'éthylcellulose, l'Eudragit® RS, l'Eudragit® RL, l'acétate de cellulose.

Encore plus préférentiellement, on utilisera les associations 30 de dérivés cellulosiques et d'au moins un polymère hydrophile pharmaceutiquement acceptable.

La fraction massique en dérivés cellulosiques est 35 avantageusement comprise entre 30 et 90% et plus avantageusement encore entre 50 et 80%.

Le pelliculage peut aussi contenir les excipients communément utilisés comme plastifiants. Ils peuvent être choisis parmi la

liste non exhaustive suivante : acétyl tributyl citrate, acétyl triéthyl citrate, glycérides acétylés, huile de ricin, dibutylphthalate, diethylphthalate, diethylsebacate, dibutylsebacate, diméthylphthalate, glycérol, glycérol

5 monostéarate, glycéryl triacétate, polyéthylène glycol, copolymères polyoxyéthylène/polyoxypropylène, propylène glycol, tributyl citrate, triéthylcitrate, adipate, azelate, enzoate, citrate, esters d'acide citrique, triacétin, huiles végétales, glycérol sorbitol, diethyloxalate, diethylmalate,

10 diethylfumarate, dibutylsuccinate, diethylmalonate, dioctylphthalate, glycéroltributyrate,

D'autres excipients d'usage courant peuvent être introduits dans l'enrobage comme les charges solubles ou insolubles (talc, sels minéraux, sucres, polyvinylpyrrolidone, polyéthylène

15 glycol...), les lubrifiants, les colorants ou les pigments.

Selon un autre de ses aspects, l'invention vise le procédé de préparation du médicament tel que défini ci-dessus.

Ce procédé consiste :

- ❖ à mettre en œuvre de granulés comportant de l'anti-hyperglycémique(s) et des excipients de granulation ou bien
- 20 de particules d'anti-hyperglycémique(s) sensiblement pur, de préférence des monocristaux d'anti-hyperglycémique(s) ;
- ❖ puis à pulvériser sur ces granulés et/ou ces particules, une solution d'enrobage comprenant un ou plusieurs produits
- 25 sélectionnés dans le groupe comprenant:
 - les macromolécules filmogènes, de préférence choisies dans le groupe comprenant : éthers de cellulose, éthers/esters de cellulose, esters de cellulose, diesters de cellulose, triesters de cellulose, acylate
 - 30 de cellulose, diacylate de cellulose, triacylate de cellulose, diacétate et triacétate de cellulose, acétate propionate de cellulose, acétate butyrate de cellulose, poly-méthacrylates, cires, copolymères d'acétate de vinyle ;
 - 35 l'éthylcellulose, l'Eudragit® RS, l'Eudragit® RL, l'acétate de cellulose étant particulièrement préférés;

- les plastifiants, de préférence choisis parmi la liste non exhaustive suivante : acétyl tributyl citrate, acétyl triéthyl citrate, glycérides acétylés, huile de ricin, dibutylphthalate, diethylphthalate, diethylsebacate, dibutylsebacate, diméthylphthalate, glycérol, glycérol monostéarate, glycéryl triacétate, polyéthylène glycol, copolymères polyoxyéthylène/polyoxypropylène, propylène glycol, tributyl citrate, triéthylcitrate, adipate, azelate, enzoate, citrate, esters d'acide citrique, triacétin, huiles végétales, glycérol sorbitol, diethyloxalate, diethylmalate, diethylfumarate, dibutylsuccinate, diethylmalonate, dioctylphthalate, glyceroltributyrate;
 - et éventuellement d'autres excipients sélectionnés parmi les charges solubles ou insolubles (talc, sels minéraux, sucres, polyvinylpyrrolidone, polyéthylène glycol...), les lubrifiants, les colorants ou les pigments ;
- en utilisant une technologie prévue à cet effet et connue de l'homme de l'art, telle que celle faisant intervenir un système WURSTER® de la société GLATT ou un système PRECISIOCOATER® de la société AEROMATIC.

Comme déjà signalé ci-dessus, les granulés susceptibles de former le coeur des microcapsules sont obtenus par des techniques conventionnelles de granulation.

Les excipients de granulation mis en oeuvre sont bien connus de l'homme de l'art et sont notamment ceux exemplifiés ci-dessus.

Les caractéristiques innovantes du procédé résultent des matériaux mis en oeuvre et de la combinaison des paramètres physiques judicieusement sélectionnés.

Conformément à l'invention, il est également proposé à titre de solution aux problèmes évoqués au début du présent exposé, à savoir : bipasse de la fenêtre d'absorption, libération massive et localisée de l'anti-hyperglycémique,

forme galénique avalable aisément, le tout dans une perspective de couverture thérapeutique efficace et sûre pendant au moins 12h (contrôle de la glycémie),

d'utiliser une pluralité de microcapsules:

- 5 ♦ constituées chacune par un cœur comportant au moins un anti-hyperglycémique et par une pellicule d'enrobage appliquée sur le cœur et permettant la libération prolongée in vivo de (des) l'anti-hyperglycémique(s),
- 10 ♦ et possédant une granulométrie comprise entre 50 et 1 000 microns, de préférence entre 100 et 750 microns, et plus préférentiellement encore, entre 200 et 500 microns ;

pour fabriquer un médicament à base d'au moins un anti-hyperglycémique et administrable par voie orale, avalable

15 aisément et qui contribue au contrôle de la glycémie (réduction du risque d'hypo ou d'hyperglycémie) sur au moins 12h, de manière sûre, en limitant les problèmes de bipasse, d'accumulation et de libération localisée et massive d'anti-hyperglycémique.

20

Selon encore un autre de ses objets, la présente invention concerne une méthode de traitement des diabètes de type II, dans lesquels on a recours à un médicament tel que défini ci-dessus en tant que produit *per se* ou en tant que produit obtenu

25 par le procédé sus-décrit.

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention et d'appréhender tous ces avantages et toutes ses variantes de réalisation.

30

EXEMPLES

Description des Figures :

- Les figures 1 et 2 sont des photographies de microcapsules respectivement avant et après le test de dissolution

35 dissolutest mis en oeuvre et défini dans les exemples.

- La figure 3 est une courbe donnant le pourcentage de dissolution (dissolutest) en fonction du temps, de microcapsules de metformine selon l'exemple 1.

- La figure 4 est une courbe donnant le pourcentage de dissolution (dissolutest) en fonction du temps, de microcapsules de metformine selon l'exemple 2.

EXEMPLE 1 :

159.5 g d'acide stéarique et 159.5 g d'éthylcellulose sont dissous dans 2870 g d'isopropanol maintenu à 50°C. Cette solution est pulvérisée sur 700 g de cristaux de metformine, HCl de diamètre moyen compris entre 100 et 200 μm et chargés dans un Spray coater Glatt GPCG1. Les conditions de pelliculage sont : température produit : 38-42°C, vitesse de pulvérisation : 10 g/min, pression d'atomisation : 2 bars.

Les microcapsules obtenues ont été testées dans un dissolutest de type II conforme à la Pharmacopée dans un milieu tampon KH_2PO_4 / NaOH à pH 6.8, maintenu à 37°C et agité à 10 tours/min.

Il apparaît que les microcapsules n'ont pas été modifiées extérieurement par le test de dissolution. Cela prouve qu'elles comportent bien un enrobage au travers duquel la metformine a diffusé lors du test de dissolution et qui n'a pas été affecté par la dissolution.

Le profil de dissolution obtenu est le suivant :

TABLEAU 1

Temps (heure)	Metformine dissoute (%)
2	14.7
4	34.4
8	69.4
12	87.5
16	94.3
20	97.1

Le profil de dissolution du produit préparé dans cet exemple est représenté figure 3.

EXEMPLE 2 :

- 51.13 g d'éthylcellulose et 5.73 g d'huile de ricin sont dissous dans un mélange de 393 g d'acétone et 262 g d'isopropanol. Cette solution est pulvérisée sur 200 g de cristaux de metformine, HCl de diamètre moyen compris entre 200 et 500 μm et chargés dans un Spray coater Niro CCl. Les conditions de pelliculage sont : température produit : 38-42°C, vitesse de pulvérisation : 4 g/min, pression d'atomisation : 1 bar.
- 10 Les microcapsules obtenues ont été testées dans un dissolutest de type II conforme à la Pharmacopée dans un milieu tampon KH_2PO_4 / NaOH à pH 6.8, maintenu à 37°C et agité à 10 tours/min. Le profil de dissolution obtenu est le suivant :

15

TABLEAU 2

Temps (heure)	Metformine dissoute (%)
2	29.4
4	56.0
8	85.2
12	93.6
16	96.9
20	98.7

Le profil de dissolution du produit préparé dans cet exemple est représenté figure 4.

20 **Exemple 3 :**

- Deux gélules de taille 00 contenant chacune 500 mg de metformine enrobée dans les microcapsules décrites dans l'exemple 2, ou bien 4 comprimés Glucophage contenant chacun 250 mg de metformine sont administrés à 12 sujets sains après dîner avec 250 ml.

25 Des échantillons de sang sont prélevés à 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36 heures après administration pour analyse de la concentration en Metformine.

- Le profil de concentration plasmatique moyen met en évidence
30 une augmentation du temps correspondant au maximum de concentration plasmatique, et ceci sans diminution très notable

de la bio-disponibilité évaluée par l'aire sous le profil de concentration plasmatique entre les instants et 36 heures.

Les principaux paramètres pharmacocinétiques sont reportés dans le tableau 3 ci-dessous.

5

TABLEAU 3

	Tmax (h)	Cmax (ng/ml)	AUC 0-36 h (ng.h/ml)	Biodisponibilité relative (%)
Glucophage	3.5	1280	10500	100
Micro capsules de l'exemple 2	7.1	1015	9660	92

Les microcapsules de l'invention représentent donc une avancée conséquente dans le domaine de l'administration de la
10 metformine par voie orale pour le traitement du diabète.

REVENDICATIONS

-1- Médicament, à base d'au moins un anti-hyperglycémique administrable par voie orale, caractérisé :

- * en ce qu'il comprend une pluralité de microcapsules
5 constituées chacune par un cœur comportant au moins un anti-hyperglycémique et par une pellicule d'enrobage appliquée sur le cœur et permettant la libération prolongée in vivo de (des) l'anti-hyperglycémique(s),
à l'exclusion des pellicules d'enrobage constituées par des
10 compositions entériques et des pellicules d'enrobage de composition ci-après:
- 1 - au moins un polymère filmogène (P1) insoluble dans les liquides du tractus, présent à raison de 50 à 90, de préférence 50 à 80 % en poids sur sec par rapport à la
15 masse totale de la composition d'enrobage et constitué par au moins un dérivé non hydrosoluble de la cellulose, à savoir l'éthylcellulose et/ou l'acétate de cellulose ;
- 2 - au moins un polymère azoté (P2) présent à raison de 2 à 25,
20 de préférence 5 à 15 % en poids sur sec par rapport à la masse totale de la composition d'enrobage et constitué par au moins un polyacrylamide et/ou un poly-N-vinylamide et/ou un poly-N-vinyl-lactame, à savoir le polyacrylamide et/ou la polyvinylpyrrolidone ;
- 25 3 - au moins un plastifiant présent à raison de 2 à 20, de préférence de 4 à 15 % en poids sur sec par rapport à la masse totale de la composition d'enrobage et constitué par au moins l'un des composés suivants : les esters du
30 glycérol, les phtalates, les citrates, les sébaçates, les esters de l'alcool cétylique, l'huile de ricin, l'acide salicylique et la cutine ;
- 4 - et éventuellement au moins un agent tensioactif et/ou
35 lubrifiant, présent à raison de 2 à 20, de préférence de 4 à 15 % en poids sur sec par rapport à la masse totale de la composition d'enrobage et choisi parmi les tensioactifs

anioniques, à savoir les sels alcalins ou alcalinoterreux des acides gras, l'acide stéarique et/ou oléique étant préférés, et/ou parmi les tensioactifs non ioniques, à savoir les esters de sorbitan polyoxyéthylénés et/ou les
5 dérivés de l'huile de ricin polyoxyéthylénés, et/ou parmi les agents lubrifiants comme les stéarates de calcium, de magnésium, d'aluminium ou de zinc, ou comme le stéarylfumarate de sodium et/ou le béhénate de glycérol; ledit agent pouvant comprendre un seul ou un mélange des
10 susdits produits ;

* en ce que ces microcapsules possèdent une granulométrie comprise entre 50 et 1 000 microns, de préférence entre 100 et 750 microns, et, plus préférentiellement encore, entre 200
15 et 500 microns.

-2- Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que la taille et l'enrobage des microcapsules sont choisis de telle sorte que, toutes choses égales par ailleurs, sa
20 biodisponibilité lors d'une administration orale à l'état nourri est au moins égale à sa biodisponibilité lors d'une administration orale à jeun.

-3- Médicament selon la revendication 1 ou 2, caractérisé
25 en ce que la fraction massique moyenne en anti-hyperglycémique des microcapsules est supérieure à 50%, de préférence supérieur ou égal à 60%.

-4- Médicament l'une quelconque des revendications 1 à 3,
30 caractérisé en ce que l'anti-hyperglycémique est choisi parmi les biguanides de préférence dans le groupe de biguanides comprenant la metformine et la buformine et leurs sels, la metformine et ses sels étant particulièrement préférés.

35 -5- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que, dans un test de dissolution in vitro dénommé dissolutest de type II conformément à la

pharmacopée, la dissolution de l'anti-hyperglycémique(s) s'étend sur au moins 8 heures, de préférence au moins 20 heures.

5 -6- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un comprimé délitable dans la bouche ou par effervescence ou non, dans un liquide, d'une poudre, d'une suspension ou d'une gélule.

10

 -7- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est constitué par une forme galénique dont la dose d' anti-hyperglycémique(s) est comprise entre 800 et 1200 mg, de préférence entre 900 et 1100 mg, et
15 plus préférentiellement encore de l'ordre de 1000 mg.

 -8- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ce médicament multi-microcapsulaire, se compose de plusieurs milliers de microcapsules telles que
20 définies dans les revendications précédentes, cette multiplicité assurant une bonne reproductibilité du transit gastro-intestinal de l'anti-hyperglycémique, réduisant ainsi le risque d'hypo ou d'hyperglycémie pour le patient.

25 -9- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le cœur des microcapsules est un granulé comportant de l'anti-hyperglycémique(s) et des excipients de granulation et/ou une particule d'anti-hyperglycémique(s) sensiblement pur, de préférence un
30 monocristal d'anti-hyperglycémique(s).

 -10- Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la pellicule d'enrobage comporte un ou plusieurs produits sélectionnés dans le groupe
35 comprenant:

 - les macromolécules filmogènes, de préférence choisies dans le groupe comprenant : éthers de cellulose, éthers

- / esters de cellulose, esters de cellulose, diesters de cellulose, triesters de cellulose, acylate de cellulose, diacylate de cellulose, triacylate de cellulose, diacétate et triacétate de cellulose, acétate propionate de cellulose, acétate butyrate de cellulose, poly-méthacrylates, cires, copolymères d'acétate de vinyle;
- 1'éthylcellulose, 1'Eudragit® RS, 1'Eudragit® RL, 1'acétate de cellulose étant particulièrement préférés;
- les plastifiants, de préférence choisis parmi la liste non exhaustive suivante : acétyl tributyl citrate, acétyl triéthyl citrate, glycérides acétylés, huile de ricin, dibutylphthalate, diethylphthalate, diethylsébaçate, dibutylsébaçate, diméthylphthalate, glycérol, glycérol monostéarate, glycéryl triacétate, polyéthylène glycol, copolymères polyoxyéthylène/polyoxypropylène, propylène glycol, tributyl citrate, triéthylcitrate, adipate, azelate, enzoate, citrate, esters d'acide citrique, triacétin, huiles végétales, glycérol sorbitol, diethyloxalate, diethylmalate, diethylfumarate, dibutylsuccinate, diethylmalonate, dioctylphthalate, glyceroltributyrate;
- et éventuellement d'autres excipients sélectionnés parmi les charges solubles ou insolubles (talc, sels minéraux, sucres, polyvinylpyrrolidone, polyéthylène glycol...), les lubrifiants, les colorants ou les pigments.

-11- Médicament selon la revendication 10, caractérisé en ce que les macromolécules filmogènes constituant le pelliculage sont des associations de dérivés cellulosiques et d'au moins une polymère hydrophile pharmaceutiquement acceptable, la fraction massique en dérivés cellulosiques étant préférentiellement comprise entre 30 et 90%, et plus préférentiellement encore entre 50 et 80%.

-12- Procédé de préparation du médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il consiste :

- ❖ à mettre en œuvre de granulés comportant de l'anti-hyperglycémique(s) et des excipients de granulation ou bien de particules d'anti-hyperglycémique(s) sensiblement pur, de préférence des monocristaux d'anti-hyperglycémique(s) ;
- ❖ puis à pulvériser sur ces granulés et/ou ces particules, une solution d'enrobage, comprenant un ou plusieurs produits sélectionnés dans le groupe comprenant:
 - les macromolécules filmogènes, de préférence choisies dans le groupe comprenant : éthers de cellulose, éthers / esters de cellulose, esters de cellulose, diesters de cellulose, triesters de cellulose, acylate de cellulose, diacylate de cellulose, triacylate de cellulose, diacétate et triacétate de cellulose, acétate propionate de cellulose, acétate butyrate de cellulose, poly-méthacrylates, cires, copolymères d'acétate de vinyle;
 - l'éthylcellulose, l'Eudragit® RS, l'Eudragit® RL, l'acétate de cellulose étant particulièrement préférés;
 - les plastifiants, de préférence choisis parmi la liste non exhaustive suivante : acétyl tributyl citrate, acétyl triéthyl citrate, glycérides acétylés, huile de ricin, dibutylphthalate, diethylphthalate, diethylsebacate, dibutylsebacate, diméthylphthalate, glycérol, glycérol monostéarate, glycéryl triacétate, polyéthylène glycol, copolymères polyoxyéthylène/polyoxypropylène, propylène glycol, tributyl citrate, triéthylcitrate, adipate, azelate, enzoate, citrate, esters d'acide citrique, triacétin, huiles végétales, glycérol sorbitol, diethyloxalate, diethylmalate, diethylfumarate, dibutylsuccinate, diethylmalonate, dioctylphthalate, glyceroltributyrate,
 - et éventuellement d'autres excipients sélectionnés parmi les charges solubles ou insolubles (talc, sels minéraux, sucres, polyvinylpyrrolidone, polyéthylène

glycol...), les lubrifiants, les colorants ou les pigments.

-13- Utilisation d'une pluralité de microcapsules :

- 5 ♦ constituées chacune par un cœur comportant au moins un anti-hyperglycémique et par une pellicule d'enrobage appliquée sur le cœur et permettant la libération prolongée in vivo de (des) l'anti-hyperglycémique(s),
- ♦ et possédant une granulométrie comprise entre 50 et 1 000
- 10 microns, de préférence entre 100 et 750 microns, et, plus préférentiellement encore, entre 200 et 500 microns ;
- pour fabriquer un médicament à base d'au moins un anti-hyperglycémique, administrable par voie orale, avalable aisément et qui contribue au contrôle de la glycémie sur au
- 15 moins 12h, de manière sûre, et en limitant les problèmes de bipasse, d'accumulation et de libération localisée et massive d'anti-hyperglycémique.

1/2

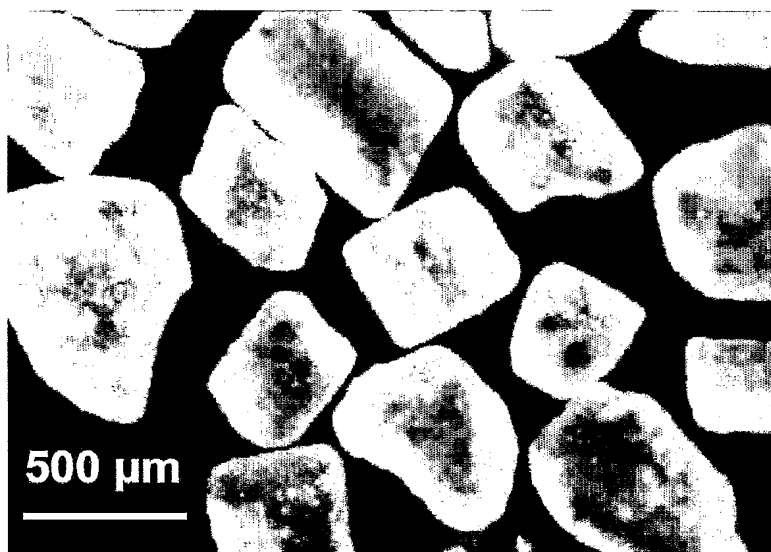


Fig 1

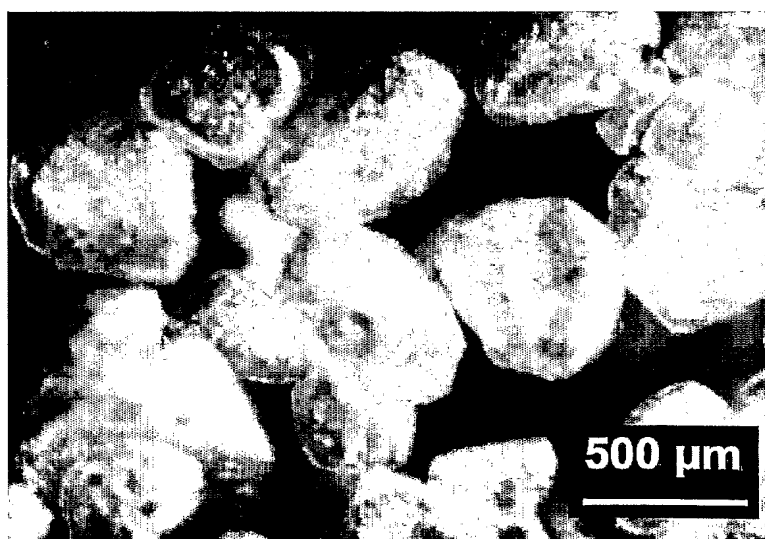


Fig 2

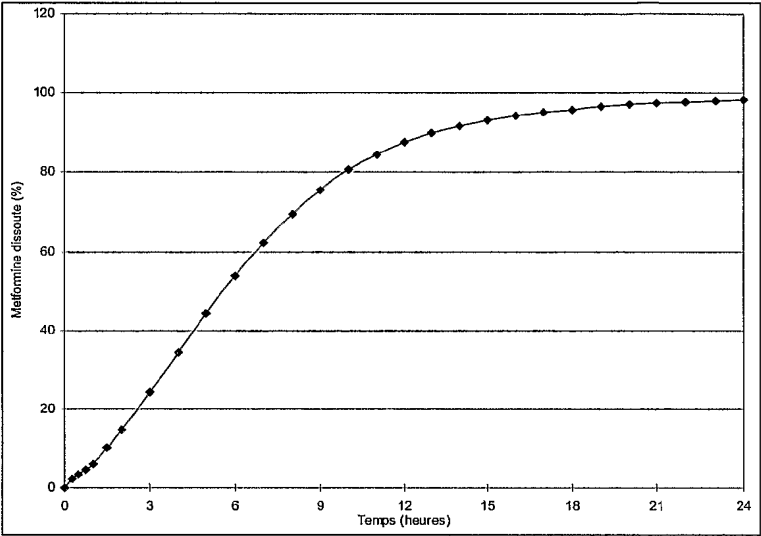


Fig 3

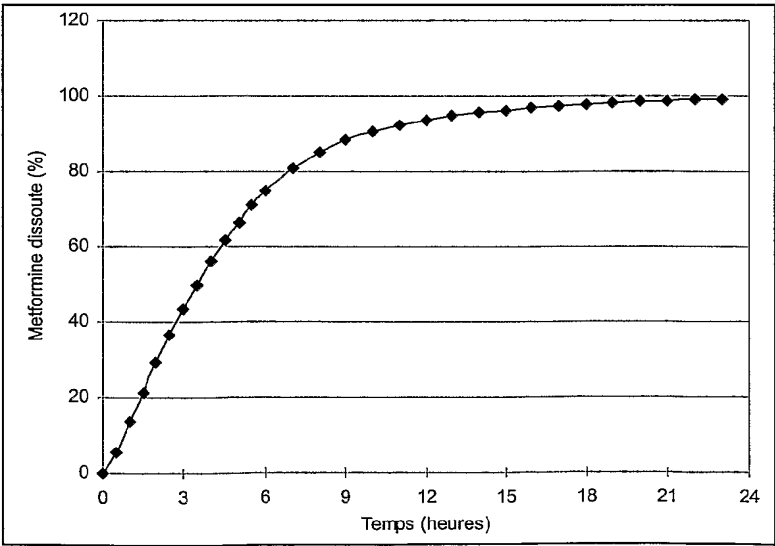


Fig 4